

DOCKET NO.: 20349 S0PCT

JPAC Rec'd PCT/PTO 16 MAR 2001

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

IN RE APPLICATION OF: Patrice CAILLAT, et al.

SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION

FILED: HEREWITH

INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/FR99/02191

INTERNATIONAL FILING DATE: 15 September 1999

FOR: DEVICE FOR CHEMICAL OR BIOLOGICAL ANALYSIS CONTAINING A PLURALITY  
OF ANALYSIS SITES ON A CARRIER, AND ITS METHOD OF PRODUCTION#3  
C. Z.  
6/18/01**REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119  
AND THE INTERNATIONAL CONVENTION**Assistant Commissioner for Patents  
Washington, D.C. 20231

Sir:

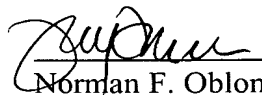
In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicant claims as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NO.</u>	<u>DAY/MONTH/YEAR</u>
FRANCE	98/11561	16 September 1998

A certified copy of the corresponding Convention application(s) was submitted to the International Bureau in PCT Application No. **PCT/FR99/02191**. Receipt of the certified copy(s) by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.

Respectfully submitted,  
OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,  
MAIER & NEUSTADT, P.C.

**22850**

  
Norman F. Oblon  
Attorney of Record  
Registration No. 24,618  
Surinder Sachar  
Registration No. 34,423

(703) 413-3000  
Fax No. (703) 413-2220  
(OSMMN 1/97)

WILLIAM E. BEAUMONT  
REGISTRATION NUMBER 30,996

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

M74

R E P U B L I Q U E F R A N C A I S E

PGT/FR 99/02191

09/805772



ESU

FR 99/2191

REC'D 27 SEP 1999	
WIPO	PCT

# BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le **26 AOUT 1999**

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS Cédex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04  
Télécopie : 01 42 93 59 30

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

---



# BREVET D'INVENTION

26bis, rue de Saint-Petersbourg

75800 Paris Cedex 08

Téléphone: 01 53.04.53.04 Télécopie: 01.42.94.86.54

Code de la propriété intellectuelle-livre VI

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

<b>0</b>	<b>RESERVE A L'INPI</b>	
0-1	Date de remise des pièces	16/09/98
0-2	N° d'enregistrement national	98 11 561
0-3	Département de dépôt	75
0-4	Date de dépôt	16-09-98
0-6	Titre de l'invention	DISPOSITIF D'ANALYSE CHIMIQUE OU BIOLOGIQUE COMPRENANT UNE PLURALITE DE SITES D'ANALYSE SUR UN SUPPORT, ET SON PROCEDE DE FABRICATION.
0-8	Etablissement du rapport de Recherche	immédiat
0-9	Votre référence dossier	b13134:mdt
<b>1</b>	<b>DEMANDEUR(s)</b>	
1-1	Identifiant	F0000031
	Nom	COMMISSARIAT A L' ENERGIE ATOMIQUE
	Nom de jeune fille	
	Adresse rue	31-33 rue de la Fédération
	Adresse code postal et ville	75015, PARIS
	Pays	France
	Nationalité	France
	Forme juridique	Autre
<b>2A</b>	<b>MANDATAIRE</b>	
	Identifiant	F0000037
	Nom	SIGNORE
	Prénoms	Robert
	Qualité	Liste spéciale: 422.5/S002, Pouvoir général: 07068
	Cabinet ou Société	BREVATOME
	Adresse rue	25 rue de Ponthieu
	Adresse code postal et ville	75008, PARIS
	N° de téléphone	01.53.83.94.00
	N° de télécopie	01.45.63.83.33
	Courrier électronique	spibrev@easynet.fr

<b>3</b>	<b>INVENTEUR(s)</b>			
3-1	Nom Prénoms Adresse rue Adresse code postal et ville Pays	CAILLAT Patrice 10 rue de Provence 38130, ECHIROLLES France		
3-2	Nom Prénoms Adresse rue Adresse code postal et ville Pays	ROSILIO Charles 16, allée de la Pommeraie 91190, GIF SUR YVETTE France		
<b>4</b>	<b>Déclaration de PRIORITE ou REQUETE du bénéfice de la date de dépôt d'une demande antérieure</b>	Etat	Date	N° de la demande
<b>6</b>	<b>Documents et Fichiers joints</b>	Fichier électronique	Pages	Détails
6-1	Description	b13134-1.doc	25	21 27 fig., 3 ex. — 2 ex.
6-2	Revendications	b13134-1.doc	5	
6-3	Dessins		7	
6-4	Abrégé	b13134-1.doc	1	
6-5	Figure d'abrégé		1	
<b>7</b>	<b>Mode de paiement</b>	Prélèvement sur compte client		
7-1	Numéro du compte client	024		
7-2	Remboursement à effectuer sur le compte n°	024		
<b>8</b>	<b>REDEVANCES</b>	Devise	Taux	Montant à payer
	Dépôt	FRF	250.00	250.00
	Rapport de recherche (R.R.)	FRF	4 500.00	4 500.00
	Déclaration d'un droit de priorité	FRF	115.00	0.00
	Revendication à partir de la 11ème	FRF	115.00	1 265.00
	Total à acquitter	FRF		6 015.00
<b>9</b>	<b>Notes destinées à l'INPI</b>			
9-1	Notes N° 1	La forme juridique du demandeur est : Etablissement de Caractère Scientifique, Technique et Industriel.		
9-2	Notes N° 2	Figures d'abrégé : 4a et 4b		
<b>10</b>	<b>Signature</b>			
10-1	Signé par	Robert SIGNORE		

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.  
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

DISPOSITIF D'ANALYSE CHIMIQUE OU BIOLOGIQUE COMPRENANT  
UNE PLURALITE DE SITES D'ANALYSE SUR UN SUPPORT, ET SON  
PROCEDE DE FABRICATION.

5

## DESCRIPTION

## Domaine technique

La présente invention a pour objet un dispositif d'analyse chimique ou biologique, comprenant un grand nombre de sites d'analyse, utilisable en  
10 particulier pour le screening en pharmacologie et pour des tests ADN en biologie.

Dans le cadre du screening, il faut déterminer sur un support comportant un grand nombre de sites recouverts du même réactif, l'effet de  
15 différentes molécules que l'on dépose sélectivement sur chaque site de façon séquentielle.

Dans le cas des tests en biologie tels que les tests ADN, chaque site du dispositif est recouvert d'une sonde ADN différente et l'analyte dont on veut  
20 connaître la séquence génomique, est mis en contact au moment de l'analyse avec l'ensemble des sites.

En chimie analytique, la demande est également forte vers la miniaturisation des cuvettes de réactions chimiques (ou réacteurs chimiques).

25 Pour toutes ces applications, il est donc important de disposer d'un support comportant le plus grand nombre possible de sites d'analyse, mais une densification élevée du nombre de sites pose certains problèmes pour obtenir la précision suffisante lors du

dépôt des gouttes de réactif ou d'échantillons sur les sites.

### État de la technique antérieure

Le document US-A-5 474 796 [1] décrit un  
5 dispositif comportant plusieurs sites d'analyse sur la surface d'un support, dans lequel les sites d'analyse sont formés par des zones hydrophiles séparées par des zones hydrophobes sur un support plan.

La figure 1 annexée représente la structure  
10 de ce dispositif avec son support plan 1, sur lequel sont définies les zones hydrophiles 3 et les zones hydrophobes 5.

Ces zones hydrophiles et hydrophobes sont réalisées sur le support 1 par photomasquage, puis  
15 réaction d'un silane hydrophile ou hydrophobe avec le support en verre.

Dans ce cas, les zones hydrophiles 3 constituées par des zones planes obligeront les gouttes de réactifs 7 déposées à rester là où elles  
20 sont en raison de la présence des zones hydrophobes adjacentes 5.

Une limitation importante de ce dispositif est due au fait que les dispenseurs de réactifs ne permettent pas de réduire la taille de la goutte 7 de  
25 façon infinie.

Aussi, lorsqu'on veut augmenter l'intégration et densifier le nombre de sites sur le support, par exemple, passer à un pas inférieur à 300  $\mu\text{m}$ , c'est la résolution du dispenseur qui limite  
30 actuellement le système car on pourrait très bien avec les procédés de lithographie restreindre la surface des



zones hydrophiles et hydrophobes pour augmenter la densités de sites.

Un autre paramètre important du dispositif est la surface utile du site car le réactif, par exemple la sonde ADN, est amené sur le site dans une solution qui est séchée sur le site. Aussi, si la surface utile du site est réduite, la quantité de réactif après séchage devient très faible.

Enfin, la manipulation du support comportant en surface les gouttes déposées est délicate.

La présente invention a précisément pour objet un dispositif d'analyse chimique ou biologique, qui permet d'augmenter l'intégration et la densification du nombre de sites sur un support, tout en utilisant les dispenseurs actuels qui en standard ne permettent pas d'avoir des gouttes de taille inférieure à 50 à 1000 picolitres avec une bonne précision spatiale de dépôt.

## 20 Exposé de l'invention

L'invention a pour objet un dispositif d'analyse chimique ou biologique comprenant un support comportant une pluralité de sites d'analyse aptes à fixer un réactif chimique ou biologique, dans lequel les sites d'analyse sont constitués par des microcuvettes s'étendant en creux dans le support, les parois latérales et le fond des microcuvettes et les zones de la surface du support entourant chaque microcuvette, dénommées bords de microcuvettes, étant réalisés en au moins un matériau hydrophile ou rendu hydrophile par un traitement, et la surface du support

située entre les bords des microcuvettes étant réalisée en un matériau hydrophobe ou rendu hydrophobe par un traitement.

On précise que dans la description et les  
5 revendications qui suivent, les termes "matériau hydrophile" signifient que le matériau est hydrophile ou qu'il a été rendu hydrophile par un traitement.

De même, les termes "matériau hydrophobe" signifient que le matériau est hydrophobe  
10 ou qu'il a été rendu hydrophobe par un traitement.

Dans ce dispositif, les microcuvettes peuvent avoir en particulier la forme d'un tronc de cône dont la petite base correspond au fond de la microcuvette.

15 Dans ce dispositif, le fait de disposer de microcuvettes réalisées en matériau hydrophile avec des bords également en matériau hydrophile, séparées en surface par un matériau hydrophobe, permet d'assurer une zone d'ancrage des gouttes dans l'épaisseur du support, en limitant ainsi le diamètre des sites  
20 d'analyse sans restreindre le volume des gouttes. On peut atteindre ainsi une densification de sites actifs plus élevée que dans le cas du support plan de l'art antérieur.

25 Selon un premier mode de réalisation du dispositif de l'invention, les parois latérales, les fonds et les bords des microcuvettes sont réalisés en le même matériau hydrophile. Ceci permet en particulier d'assurer le recentrage et l'ancrage des gouttes de réactifs dans le microcuvettes ainsi que sur le bord  
30 des microcuvettes lorsque la goutte déborde de la microcuvette.

Selon un second mode de réalisation du dispositif de l'invention, les fonds des microcuvettes sont réalisés en un premier matériau hydrophile et au moins une partie des parois latérales des microcuvettes ainsi que les bords des microcuvettes sont réalisés en un second matériau hydrophile, seul le premier matériau hydrophile étant apte à fixer le réactif chimique ou biologique.

Cette structure particulière permet d'attirer la goutte dans la microcuvette au moyen du second matériau hydrophile et d'assurer la fixation du réactif dans le fond de la microcuvette par l'intermédiaire du premier matériau hydrophile. Cette disposition est particulièrement intéressante lorsque le réactif est dilué dans une solution aqueuse. La réalisation de microcuvettes permet aussi également d'observer à l'étape d'analyse une fluorescence dans un plan différent du plan du substrat qui souvent génère un signal parasite (fluorescence) intrinsèque à la nature du substrat.

Ainsi, la goutte de solution aqueuse mouillera le second matériau hydrophile mais le réactif présent en faible quantité sera fixé sur le fond de la microcuvette.

Selon l'invention, le support du dispositif peut être un support passif en verre, en silicium ou en polymère organique, n'ayant pas de fonction particulière. On peut aussi utiliser dans l'invention un support comprenant un substrat actif à système électronique intégré ayant diverses fonctions électroniques, par exemple d'adressage des sites, de chauffage localisé ou de CCD pour la détection intégrée de fluorescence.

Un substrat actif de ce type est décrit par exemple dans le document Eggers et al, A versatile biochip for gene-based diagnostics, 1996, IEEE, p. 87-92 [2]. Dans le cas de tels supports, le substrat actif  
5 est généralement recouvert d'une couche de polymère dans laquelle sont formées les microcuvettes.

Dans le dispositif de l'invention le(s) matériau(x) hydrophile(s) peuvent être des matériaux comportant des groupes hydrophiles choisis parmi les  
10 groupements époxy, -OH, -SH, -NH-, -NH<sub>2</sub> et -COOH.

Le matériau hydrophobe peut être constitué par le support lui-même dans le cas d'un support en polymère organique hydrophobe ou être formé sur le support. Généralement, le matériau hydrophobe comporte  
15 des groupes hydrocarbonés ou fluorocarbonés.

Le matériau de base utilisé, verre ou silicium, peut être rendu sélectivement hydrophile ou hydrophobe par un traitement de surface approprié.

L'invention a encore pour objet un procédé  
20 de fabrication d'un dispositif d'analyse chimique ou biologique tel que décrit ci-dessus.

Selon un premier mode de réalisation, ce procédé comprend les étapes suivantes :

- a) réaliser en creux sur la surface du support des  
25 microcuvettes (ou micropuits ou microcavités),
- b) définir les zones de la surface du support devant comporter un matériau hydrophobe, et
- c) former ensuite un matériau hydrophile sur les zones de la surface du support et des microcuvettes ne  
30 comportant pas de matériau hydrophobe.

Selon une variante de mise en oeuvre de ce premier mode de réalisation, le procédé comprend les étapes suivantes :

a) réaliser en creux sur la surface du support des microcuvettes, et

b) former un matériau hydrophile sur les zones de la surface du support devant comporter un matériau hydrophile.

Les procédés décrits ci-dessus sont adaptés à la réalisation de microcuvettes dont les parois latérales, les fonds et les bords sont réalisés en le même matériau hydrophile.

Selon un second mode de réalisation du procédé de l'invention adapté à la formation des microcuvettes comportant deux matériaux hydrophiles différents, le procédé comprend avantageusement les étapes suivantes :

a) réaliser en creux sur la surface du support des microcuvettes,

b) définir les zones de la surface du support devant comporter un matériau hydrophobe,

c) définir ensuite sur la surface du support ne comportant pas de matériau hydrophobe et sur la surface des microcuvettes, des premières zones correspondant aux emplacements du premier matériau hydrophile et des secondes zones correspondant aux emplacements du second matériau hydrophile, et

e) former le premier matériau hydrophile sur les premières zones et le second matériau hydrophile sur les secondes zones.

Lorsque le support est en un matériau non hydrophobe, le procédé comprend de plus une étape complémentaire de formation d'un matériau hydrophobe sur les zones de la surface du support devant comporter un matériau hydrophobe.

Pour mettre en oeuvre le procédé de l'invention, on commence tout d'abord par creuser des microcuvettes dans l'épaisseur du support. Des techniques classiques de lithographie suivies de gravure sèche ou de gravure chimique peuvent être  
5 utilisées pour cette opération.

Lorsque le support est en silicium, on peut réaliser les microcuvettes par gravure chimique préférentielle des plans cristallins, ce qui permet  
10 d'obtenir une microcuvette avec un flanc à  $54^\circ$  et un fond plat. Le pas des microcuvettes peut aller de 10 à 500  $\mu\text{m}$  et la profondeur des microcuvettes peut être de 5 à 500  $\mu\text{m}$ . On utilise généralement un procédé lithographique pour définir les microcuvettes aux  
15 endroits voulus.

Dans le cas d'un support en verre, on peut réaliser les microcuvettes par gravure sèche isotrope, sans angles, en utilisant également un procédé lithographique pour définir l'emplacement des  
20 microcuvettes.

Dans le cas où le support comprend un substrat actif à fonction électronique, le support est de préférence muni sur sa surface supérieure d'une couche de polymère ou d'oxyde minéral dans laquelle on  
25 réalise les microcuvettes par gravure, en utilisant également un procédé lithographique pour définir l'emplacement des microcuvettes.

Dans tous les cas, on peut obtenir des microcuvettes de 5 à 500  $\mu\text{m}$  de profondeur, avec un pas  
30 de microcuvettes de 10 à 500  $\mu\text{m}$ , et une ouverture supérieur de microcuvette de 3 à 450  $\mu\text{m}$ .

Les étapes suivantes du procédé consistent à former sur la surface du support les zones de

matériau hydrophobe et les zones de matériau(x) hydrophile(s).

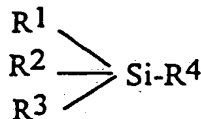
Ces zones peuvent être formées en modifiant la surface du support par greffage de groupes hydrophobes ou hydrophiles.

Toutefois, dans le cas où le support est en polymère organique hydrophobe ou recouvert de polymère organique hydrophobe, il n'est pas nécessaire de modifier la surface du support pour créer les zones hydrophobes.

Lorsque le support est en silicium ou en verre, on peut réaliser cette modification en faisant réagir le silicium ou le verre avec un agent de silanisation hydrophobe ou hydrophile.

Dans le cas où le support est en silicium, on le soumet préalablement à une oxydation puis à un traitement classique de nettoyage (ex : HCl) pour disposer de groupements OH en surface permettant la réaction avec l'agent de silanisation.

L'agent de silanisation hydrophobe peut être un silane de formule :



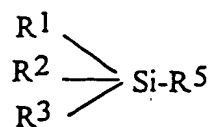
dans laquelle  $R^1$ ,  $R^2$  et  $R^3$  qui peuvent être identiques ou différents, sont choisis parmi les groupes alkoxy en  $C_1$  à  $C_3$  et les atomes d'halogènes (de préférence le chlore), et  $R^4$  est un groupe hydrocarboné ou fluorocarboné, linéaire ou ramifié.

De préférence, le groupe hydrocarboné ou fluorocarboné comprend de 4 à 18 atomes de carbone.

A titre d'exemples d'agent de silanisation hydrophobe, on peut citer les composés suivants :

- un produit commercial dénommé "Repelsilane",
- l'octadécyl trichlorosilane,
- 5 - l'octadécyl triéthoxysilane,
- le tridécafluoro-1,1,2,2-tétrahydrooctyldiméthyl chlorosilane,
- le 3-(1,1-dihydroperfluorooctyloxy) propyltriéthoxysilane,
- 10 - l'hexaméthyl disilazane (HMDS).

L'agent de silanisation hydrophile, peut être constitué par un silane de formule :



15

dans laquelle  $R^1$ ,  $R^2$  et  $R^3$  qui peuvent être identiques ou différents, sont choisis parmi les groupes alcoxy en  $C_1$  à  $C_3$  et les atomes d'halogène, de préférence le chlore, et  $R^5$  est un groupe hydrocarboné, linéaire ou ramifié, comportant au moins un groupe hydrophile  
20 choisi parmi les groupes époxy, -OH, -SH, -NH<sub>2</sub>, -NH- et -COOH.

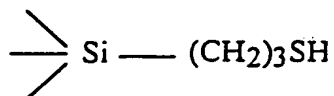
Le groupe hydrocarboné comprend avantageusement 3 à 18 atomes de carbone.

25 A titre d'exemples d'agent de silanisation hydrophile, on peut citer les composés suivants :

- l'aminopropyl triméthoxysilane "γ APS",
- la triméthoxysilylpropyl-diéthylènetriamine "DETA",
- 30 - le N-(2-aminoéthyl)-3-aminopropyltriméthoxy-silane "EDA",



- le N,N-bis(hydroxyéthyl)aminopropyltriéthoxy-silane,
  - le produit commercial "Bind Silane",
  - l'aminoéthylaminométhyl phénétyle triméthoxysilane
- 5 "PEDEA" ou encore le mercaptopropyltriméthoxysilane



On peut aussi former le matériau hydrophobe et/ou le matériau hydrophile sur le support en utilisant pour l'introduction des groupes hydrophiles

10 ou hydrophobes, des thiols ou des disulfures. Dans ce cas, on dépose tout d'abord sur les zones à modifier une couche métallique en or, en argent, en cuivre ou en l'un de leurs alliages, puis on fait réagir cette couche avec un thiol ou un disulfure comportant un ou

15 plusieurs groupes hydrophiles ou hydrophobes. Comme précédemment, les groupes hydrophobes peuvent être des groupes hydrocarbonés ou fluorocarbonés, linéaires ou ramifiés. Les groupes hydrophiles peuvent être choisis parmi les groupes époxy, -OH, -NH-, -NH<sub>2</sub>, -COOH et -SH.

20 Pour fonctionnaliser Au, Ag, Cu, à titre de thiols et de disulfures utilisables, on peut citer les composés suivants :

- l'octadécane thiol, R-SH (R=C<sub>8</sub> à C<sub>18</sub>), hydrophobe
  - l'hexadécane thiol,
- 25 - le 3-mercaptopropionique acide → hydrophile (pour rendre l'or hydrophile).

Selon le procédé de l'invention, les zones de matériau(x) hydrophile(s) ou rendu(s)

30 hydrophile(s) et les zones de matériau hydrophobe ou rendu hydrophobe peuvent être définies sur le support

par les techniques classiques de la micro-électronique, en utilisant par exemple des procédés lithographiques employant des photorésists négatifs ou positifs, avec un niveau de masquage et des développements de résine.

- 5 Les zones développées sont traitées puis on enlève la résine et on traite les zones mises à nu par un autre agent de silanisation.

Ainsi, selon l'invention, on peut former les zones hydrophiles et hydrophobes sur le support par des procédés de gravure, en traitant par exemple toute  
10 la surface du support pour le rendre hydrophile ou hydrophobe, et en éliminant ensuite le matériau hydrophile ou hydrophobe sur certaines zones du support, par exemple au moyen d'un laser. Les zones  
15 mises à nu peuvent ensuite être traitées pour former les zones hydrophobes ou hydrophiles voulues.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront mieux à la lecture de la description qui suit, donnée bien entendu à titre  
20 illustratif et non limitatif, en référence aux dessins annexés.

#### Brève description des dessins

25 La figure 1 déjà décrite illustre schématiquement un dispositif conforme à l'art antérieur.

La figure 2 illustre le premier mode de réalisation du dispositif de l'invention.

30 La figure 3 illustre le deuxième mode de réalisation du dispositif de l'invention.

Les figures 4A et 4B illustrent la mise en place de goutte de réactif dans un dispositif conforme à l'invention.

5 Les figures 5 à 7 illustrent l'intérêt du second mode de réalisation du dispositif de l'invention pour accrocher le réactif biologique au fond de la microcuvette.

10 Les figures 8A à 8E illustrent les différentes étapes du procédé de fabrication du dispositif de l'invention, lorsqu'on utilise une silanisation pour la réalisation des zones hydrophobes et hydrophiles.

15 Les figures 9A à 9D illustrent les différentes étapes du procédé de fabrication d'un dispositif conforme à l'invention utilisant des thiols pour former les zones hydrophiles et hydrophobes.

20 Les figures 10A à 10C illustrent les étapes du procédé de fabrication d'un dispositif de l'invention utilisant un substrat actif à fonction électronique, recouvert d'une couche de polymère hydrophobe.

25 Les figures 11A à 11G illustrent les différentes étapes du procédé de fabrication d'un dispositif conforme au second mode de réalisation de l'invention.

#### Exposé détaillé des modes de réalisation

30 Sur la figure 2, on a illustré le premier mode de réalisation du dispositif de l'invention, dans lequel on utilise un seul matériau hydrophile.

Sur cette figure, on voit le support 21 dans lequel sont creusées les microcuvettes 23 qui ont

une forme tronconique dont la petite base correspond au fond 24 de la microcuvette. Dans le premier mode de réalisation de l'invention, les fonds 24, les parois latérales 25 et les zones de la surface du support entourant chaque microcuvette, dénommées ci-après bords des microcuvettes 26, sont constitués de matériau hydrophile, alors que la surface du support située entre les bords des microcuvettes est constituée de matériau hydrophobe 27.

La figure 3 représente de façon schématique le second mode de réalisation du dispositif de l'invention, dans lequel on utilise deux matériaux hydrophiles différents.

Sur cette figure, on a repris les mêmes références pour désigner le support 21, les microcuvettes 23 et les zones de matériau hydrophobe 27. Dans ce cas, les fonds des microcuvettes 24 et une partie de leurs parois latérales 25a sont réalisés en un premier matériau hydrophile alors que le reste de leur parois latérales 25b et les bords 26 sont réalisés en un second matériau hydrophile. Ceci permet, comme on le verra ci-après de réaliser l'accrochage du réactif chimique ou biologique au fond des microcuvettes.

Dans ces deux modes de réalisation du dispositif de l'invention, la structuration tridimensionnelle du support permet d'obtenir de nombreux avantages.

En effet, cette structuration permet de limiter la surface des sites réactifs correspondant à l'ouverture des microcuvettes, puisque celles-ci sont creusées dans l'épaisseur du support et peuvent contenir davantage de réactif ou d'échantillon pour une surface utile plus petite.

Ainsi, on peut diminuer le pas et la taille des microcuvettes à des dimensions microniques sans être limité, d'une part, par la précision de positionnement du robot dispenseur de réactifs ou d'échantillons et, d'autre part, par le volume des gouttes. Par ailleurs, la réalisation sur le pourtour des microcuvettes et dans les microcuvettes de zones hydrophiles par rapport au reste du support hydrophobe permet l'ancrage et le guidage de la goutte dans la microcuvette comme on peut le voir sur les figures 4A et 4B.

En se reportant à la figure 4A, on voit le dispositif conforme à ce premier mode réalisation de l'invention, qui comporte un support 21 muni de microcuvettes 23 avec les zones hydrophiles 24 et les zones hydrophobes 27.

Sur la figure 4A, on a représenté le dispositif dans le stade d'alimentation en gouttes 29 de réactif ou d'échantillon qui peuvent être déposés par un microdispenseur (robot de micropipettage) ou par des têtes d'impression à jet d'encre.

Comme on le voit sur la figure 4A, les gouttes ne sont pas forcément positionnées au droit de l'ouverture des microcuvettes. Mais la présence des zones hydrophiles 24 et hydrophobes 27 permet l'ancrage et le guidage de la goutte dans la microcuvette. En effet, en raison des tensions superficielles créées par l'hydrophilicité de la surface, la goutte déposée va pouvoir glisser pour se positionner et remplir parfaitement les microcuvettes comme représenté sur la figure 4B. Ainsi, pour une taille de goutte donnée, on peut réduire le pas des sites réactifs sur le support sans risque de pontage entre les gouttes, donc de

mixage des réactifs. Par ailleurs, même avec une précision de placement de gouttes imparfaite, on obtient une répartition spatiale parfaite donnée par la position des microcuvettes qui peut être extrêmement  
5 précise par l'utilisation du micro-usinage, comme on le verra ci-après.

Avec ce dispositif, on note également que le rapport volume/surface au contact du réactif est augmenté pour une occupation au sol identique. Cela  
10 veut dire que si le réactif contient des substances devant se fixer après séchage sur la zone hydrophile, il y en aura beaucoup plus.

Par ailleurs, ce type de structure peut être ajouté au-dessus d'un substrat actif, par exemple  
15 une puce à ADN avec moyens de chauffage ou de lecture intégrés.

Enfin, cette structure du dispositif de l'invention est compatible avec les procédés de synthèse d'ADN in situ localisée. En effet, une fois  
20 que la première base de la sonde est fixée dans les microcuvettes, la sonde peut être construite base après base dans ces microcuvettes.

Sur les figures 5 à 7, on a illustré l'intérêt d'utiliser un dispositif conforme au second  
25 mode de réalisation du dispositif de l'invention, pour la réalisation de puces à ADN.

Sur la figure 5, on voit l'une des microcuvettes du dispositif, qui comporte un support  
30 51 muni de microcuvettes 53, avec présence d'un premier matériau hydrophile 55 et d'un second matériau hydrophile 57 dans les microcuvettes et sur leurs bords, et d'un matériau hydrophobe 59 entre les microcuvettes.

Sur cette figure, on a illustré les groupes hydrophiles 56 du premier matériau hydrophile, les groupes hydrophiles 58 du second matériau hydrophile et les groupes hydrophobes 60 du matériau hydrophobe. On remarque ainsi que les groupes hydrophiles 56 sont différents des groupes hydrophiles 58, les groupes hydrophiles 56 étant choisis pour fixer le réactif, par exemple les sondes nucléiques 63 présentes dans la goutte de réactif 65. La figure 5 correspond ainsi au stade d'alimentation en gouttes du dispositif.

Sur la figure 6, on a illustré la phase de recentrage de la goutte 65 sur les zones hydrophiles en raison de la répulsion des zones hydrophobes 59.

La figure 7 illustre l'étape de fixation des sondes nucléiques 63 sur le premier matériau hydrophile 55 par réaction des groupes hydrophiles 64 de la sonde avec les groupes hydrophiles 56 du premier matériau hydrophile 55.

A titre d'exemple, la sonde nucléotidique peut être fonctionnalisée avec un groupe OH et le premier matériau hydrophile 55 peut comporter des groupes hydrophiles OH tandis que le second matériau hydrophile comporte des groupes hydrophiles COOH ou NH<sub>2</sub>. De cette façon, il n'y aura couplage avec la sonde que sur le premier matériau hydrophile 55.

Une technique de fixation de sondes oligonucléotidiques sur des surfaces de verre préalablement modifiées par silanisation est décrite par Beattie et al dans Clin. Chem., vol. 39, n°4, 1993, pages 714-722 [3].

Ce mode de réalisation du dispositif de l'invention est particulièrement intéressant car lorsqu'on réduit le pas des microcuvettes, les sites

recouverts par les différents réactifs deviennent très proches les uns des autres, ce qui pose un problème lors de la détection si on lit par fluorescence les résultats. En permettant l'emploi de gouttes  
5 relativement volumineuses tout en conservant un espace suffisant entre sites à réactif, on simplifie la chaîne d'acquisition.

De plus, avec cette amélioration, on n'obtient du réactif que sur le fond des microcuvettes,  
10 ce qui permettra de situer l'endroit de la réaction chimique éventuelle sur un plan différent. Ceci est utilisable par un système de lecture pour s'affranchir par exemple de la fluorescence parasite de la surface du support (focalisation différentielle).

15 Sur les figures 8A à 8E, on a illustré les différentes étapes de réalisation d'un dispositif conforme à l'invention, utilisant un seul matériau hydrophile et dans lequel on forme les zones hydrophiles et hydrophobes par silanisation, le support  
20 étant en silicium.

Sur la figure 8A, on voit le support 21 en silicium de départ.

Sur la figure 8B, on a représenté l'étape de formation des microcuvettes 23 dans le support 21.  
25 Ceci peut être effectué par lithographie et gravure chimique selon des plans cristallins. On obtient ainsi des microcuvettes tronconiques avec un flanc à  $54^\circ$  et un fond plat. Le pas des microcuvettes peut aller de 10 à 500  $\mu\text{m}$  et leur profondeur peut être de 5 à  
30 500  $\mu\text{m}$ , ceci pour pouvoir s'adapter aux tailles de gouttes dispensées par les automates de dépôt de réactifs.



Après lithogravure des microcuvettes, on soumet l'ensemble à un traitement d'oxydation thermique à une température supérieure à 800°C, par exemple à 850°C, pour disposer de groupements OH à la surface du silicium.

Sur la figure 8C, on a représenté l'étape de définition des zones de matériau hydrophobe au moyen d'un masque. Ce masque peut être constitué par une résine photosensible R que l'on dépose sur le support, et que l'on soumet ensuite à une insolation selon le motif à obtenir suivie d'un développement pour mettre à nu les zones qui devront être hydrophobes. La résine R peut être n'importe quel photorésist utilisable en microélectronique. On peut utiliser en particulier la résine Shippley positive (S1813 ou STR1075), ou négative SAL 601 et le développeur Microposit MF 319.

Sur la figure 8D, on a représenté l'étape de création des zones de matériau hydrophobe 27 par silanisation hydrophobe du support en silicium mis à nu au moyen de l'agent de silanisation par exemple le tridécafluorotétrahydro-octyltriéthoxy-silane (appelé aussi F13).

Après création des zones de matériau hydrophobe 27, on élimine la résine R par dissolution par exemple dans l'acétone pour mettre à nu les zones devant comporter le matériau hydrophile.

Sur la figure 8E, on a représenté la réalisation des zones de matériau hydrophile 24 par silanisation hydrophile au moyen de EDA,  $\gamma$ APS ou DETA.

Les figures 9A à 9D illustrent une variante de réalisation du dispositif de l'invention avec un support en silicium recouvert d'une métallisation en or, dans laquelle on utilise des

thiols pour la création du matériau hydrophile et du matériau hydrophobe. Dans ce cas, comme précédemment on réalise en creux dans le support en silicium 21 des microcuvettes tronconiques 23 par lithogravure chimique  
 5 selon des plans cristallins, puis on dépose sur l'ensemble du support de l'or pour former une couche ayant une épaisseur de 50 à 5000 Å.

La figure 9A représente le support 21 muni des microcuvettes 23 et revêtu d'une couche d'or M.

10 Après création des microcuvettes, on définit les zones de matériau hydrophobe par lithographie au moyen d'une résine photosensible R comme décrit précédemment.

On obtient ainsi la structure représentée  
 15 sur la figure 9B où la couche d'or M est mise à nu sur les zones qui devront être hydrophobes.

On forme ensuite le matériau hydrophobe par réaction du dépôt d'or mis à nu avec un thiol hydrophobe tel que l'octadécane thiol  $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{17}-\text{SH}$ .

20 On obtient ainsi la structure représentée sur la figure 9C avec les zones de matériau hydrophobe 27. Après cette opération, on élimine comme précédemment la couche de résine R par dissolution dans l'acétone et on traite par un thiol hydrophile les  
 25 zones dégagées. On peut utiliser comme thiol hydrophile  $\text{HO}(\text{CH}_2)_n\text{SH}$ ,  $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_n\text{SH}$  ( $n = 3$  à 18).

On obtient ainsi la structure représentée sur la figure 9D, comportant les zones de matériau hydrophile 24 séparées par les zones de matériau  
 30 hydrophobe 27.

Bien que dans les deux exemples décrits ci-dessus, on ait réalisé les matériaux hydrophobes et hydrophiles par un traitement de silanisation ou de

modification au moyen d'un thiol, il va de soi que l'on pourrait combiner ces deux possibilités de modification de la surface du support en effectuant certaines zones par silanisation et d'autres zones par réaction du support avec un thiol ou par d'autres techniques d'hydrophilisation ou d'hydrophobisation.

Dans le cas où le support est un verre, on peut former les microcuvettes par une gravure isotropique sans angle et former ensuite les zones de matériau hydrophile et les zone de matériau hydrophobe par les procédés décrits ci-dessus. Dans le cas où on forme ces zones par silanisation, il n'est pas nécessaire de soumettre le support à une oxydation, après gravure des microcuvettes car le verre comporte les fonctions OH nécessaires pour les étapes suivantes. On peut aussi, dans le cas d'un substrat en verre, réaliser les zones de matériau hydrophile et de matériau hydrophobe après dépôt d'or par réaction avec un thiol et combiner ces procédés.

L'intérêt du substrat en verre est de permettre la réalisation des microcuvettes par une gravure isotropique, ce qui conduit à des microcuvettes sans angles facilitant ainsi les diverses opérations de rinçage.

Comme on l'a vu précédemment, l'invention peut être également mise en oeuvre sur un support comportant un substrat actif avec électronique intégrée. Un tel substrat peut permettre un chauffage localisé des sites ou une lecture par CCD d'un appariement réactif-électrolyte à analyser sur ces sites, ou un adressage de chaque site pour y appliquer une tension par exemple. Le substrat actif peut être

réalisé en silicium ou en verre en utilisant les techniques des écrans plats.

Dans ce cas, la structure de l'invention est construite au-dessus du substrat actif terminé en recouvrant celui-ci d'une couche d'oxyde minéral ou encore d'une couche de polymère, la couche déposée étant suffisamment épaisse pour y former des microcuvettes de profondeur voulue.

Après réalisation des microcuvettes dans cette couche de polymère ou d'oxyde minéral, on peut définir les zones hydrophiles et hydrophobes comme précédemment par réaction d'une couche d'or avec un thiol. Dans le cas d'une couche de polymère, les zones hydrophobes peuvent aussi être constituées par la couche de polymère.

Sur les figures 10A à 10C, on a illustré les étapes de réalisation de ce dispositif.

Sur la figure 10A, on a représenté le substrat actif 21a muni de plots de surface 21b aux emplacements qui correspondent aux sites d'analyse.

Sur ce substrat 21a, on dépose tout d'abord une couche épaisse de polymères 21c, par exemple de polyimide ayant une épaisseur de 5 à 100  $\mu\text{m}$ , puis on creuse dans cette couche des microcuvettes 23 par exemple par lithogravure, moulage, ...

On dépose ensuite sur les zones du support qui devront être en matériau hydrophile une couche d'or M de façon à définir les zones hydrophiles.

Sur la figure 10B, on a représenté la structure obtenue qui comprend le substrat actif 21a, les plots de surface 21b, la couche de polymères 21c, les microcuvettes 23 et la couche d'or M.

Sur la figure 10C, on a représenté l'étape de formation des zones hydrophiles par traitement de l'ensemble par un thiol hydrophile qui va se fixer sur l'or M pour former les zones de matériau hydrophile 24.

5 Dans ce cas, il n'est pas nécessaire de réaliser des zones de matériau hydrophobe, celles-ci étant constituées par la couche de polymère 21c restant entre les microcuvettes 23.

10 Sur les figures 11A à 11G, on a illustré les différentes étapes du procédé de fabrication d'un dispositif conforme au second mode de réalisation de l'invention, comportant deux types de matériaux hydrophiles.

15 Dans ce cas, comme représenté sur la figure 11A, on part d'un support 51 par exemple en silicium, dans lequel on réalise des microcuvettes 53 de forme tronconique par lithogravure, comme dans le premier exemple de réalisation. On dépose ensuite sur l'ensemble une couche d'or M.

20 Sur la figure 11B, on a représenté la structure du support après dépôt d'une résine R sur les endroits qui correspondent aux zones devant comporter le second matériau hydrophile.

25 Sur la figure 11C, on a représenté la structure obtenue après gravure de l'or pour retirer la couche d'or sur les zones correspondant au matériau hydrophobe et sur les zones correspondant au premier matériau hydrophile, et après élimination de la résine R sur les zones correspondant au second matériau  
30 hydrophile.

Sur la figure 11D, on a représenté la structure obtenue après protection des fonds des microcuvettes par une de résine R identique ou

différente de la première résine R. Cette protection peut être obtenue par les techniques lithographique en déposant une résine photosensible insolée aux endroits voulus et éliminé ensuite sur les zones voulues.

5 Sur la figure 11E, on a représenté la création des zones de matériau hydrophobe 59 qui sont formées par silanisation hydrophobe du support au moyen de Repel Silane.

10 Sur la figure 11F, on a représenté la création des zones 57 du second matériau hydrophile par réaction de l'or avec un thiol hydrophile comportant des groupe COOH ou NH<sub>2</sub>, par exemple HOOC-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-SH.

15 Sur la figure 11G, on a représenté la structure finale obtenue après avoir éliminé la résine R du fond des microcuvettes et avoir soumis le support à un traitement de silanisation au moyen de OH(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>-SH.

20 Ainsi, avec le traitement de silanisation, on obtient un premier matériau hydrophile 55 comportant des groupes hydrophiles OH alors que les zones 57 du second matériau hydrophile comportent des groupes hydrophiles COOH. Ainsi, en utilisant un réactif à groupes OH tel qu'un oligonucléotide, un linker ou un précurseur de synthèse nucléotidique, fonctionnalisé  
25 avec un groupe OH, on pourra fixer préférentiellement ce réactif dans le fond des microcuvettes.

Bien entendu, dans l'exemple de réalisation décrit ci-dessus, l'ordre des étapes pourrait être différent. De même, on pourrait utiliser d'autres  
30 techniques pour créer respectivement les zones 57 et 55 du premier et du second matériau hydrophile, et supprimer l'étape de création des zones 59 de matériau hydrophobe dans le cas d'un support hydrophobe.

## Références citées

- [1] : US-A-5 474 796.
- 5 [2] : Eggers et al, A versatile biochip for gene-based  
diagnostics, 0-7803-3271-7/96, 1996, IEEE, p. 87-  
92.
- [3] : Beattie et al dans Clin. Chem., vol. 39, n°4,  
1993, pages 719-722.

## REVENDEICATIONS

1. Dispositif d'analyse chimique ou biologique comprenant un support comportant une pluralité de sites d'analyse aptes à fixer un réactif chimique ou biologique, dans lequel les sites d'analyse sont constitués par des microcuvettes (23, 53) s'étendant en creux dans le support (21, 51), les parois latérales et le fond des microcuvettes et les zones de la surface du support entourant chaque microcuvette, dénommées bords de microcuvettes, étant réalisés en au moins un matériau hydrophile (24, 26, 55, 57), et la surface du support située entre les bords des microcuvettes étant réalisée en un matériau hydrophobe (27, 59).
2. Dispositif selon la revendication 1, dans lequel les microcuvettes ont la forme d'un tronc de cône dont la petite base correspond au fond de la microcuvette.
3. Dispositif selon la revendication 1 ou 2, dans lequel les parois latérales, les fonds et les bords des microcuvettes sont réalisés en le même matériau hydrophile.
4. Dispositif selon la revendication 1 ou 2, dans lequel les fonds des microcuvettes sont réalisés en un premier matériau hydrophile (24, 55), et au moins une partie des parois latérales des microcuvettes ainsi que les bords des microcuvettes sont réalisés en un second matériau hydrophile (26, 57), seul le premier matériau hydrophile étant apte à fixer le réactif chimique ou biologique.
5. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans lequel le(s) matériau(x) hydrophile(s) comportent des groupes hydrophiles



choisis parmi les groupements époxy, -OH, -SH, -NH-, -NH<sub>2</sub> et -COOH.

6. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans lequel le matériau hydrophobe comprend des groupes hydrophobes choisis parmi les groupes hydrocarbonés et fluorocarbonés.

7. Dispositif selon les revendications 4 et 5, dans lequel le premier matériau hydrophile comporte des groupes hydrophiles différents de ceux du second matériau hydrophile.

8. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, dans lequel le support comprend un substrat actif à système électronique intégré à fonction électronique.

9. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, dans lequel le réactif biologique est un oligonucléotide.

10. Procédé de fabrication d'un dispositif d'analyse chimique ou biologique selon la revendication 3, comprenant les étapes suivantes :

a) réaliser en creux sur la surface du support des microcuvettes,

b) définir les zones de la surface du support devant comporter un matériau hydrophobe, et

c) former un matériau hydrophile sur les zones de la surface du support et des microcuvettes ne comportant pas de matériau hydrophobe.

11. Procédé de fabrication d'un dispositif d'analyse chimique ou biologique selon la revendication 3, comprenant les étapes suivantes :

a) réaliser en creux sur la surface du support des microcuvettes, et

b) former un matériau hydrophile sur les zones de la surface du support devant comporter un matériau hydrophile.

5 12. Procédé de fabrication d'un dispositif d'analyse chimique ou biologique selon la revendication 4, qui comprend les étapes suivantes :

a) réaliser en creux sur la surface du support des microcuvettes,

10 b) définir les zones de la surface du support devant comporter un matériau hydrophobe,

c) définir ensuite sur la surface du support ne comportant pas de matériau hydrophobe et sur la surface des microcuvettes, des premières zones correspondant aux emplacements du premier matériau hydrophile et des  
15 secondes zones correspondant aux emplacements du second matériau hydrophile, et

e) former le premier matériau hydrophile sur les premières zones et le second matériau hydrophile sur les secondes zones.

20 13. Procédé selon l'une quelconque des revendications 10 à 12 comprenant une étape complémentaire de formation d'un matériau hydrophobe sur les zones de la surface du support devant comporter un matériau hydrophobe.

25 14. Procédé selon l'une quelconque des revendications 10 à 13, dans lequel les microcuvettes sont réalisées par gravure.

30 15. Procédé selon l'une quelconque des revendications 10 à 13, dans lequel le support comprend une couche de surface en polymère ou en oxyde minéral déposée sur un substrat actif à fonction électronique, et les microcuvettes sont réalisées par gravure dans la couche de polymère ou d'oxyde.

16. Procédé selon la revendication 13, dans lequel le support étant en silicium ou en verre, on forme le matériau hydrophobe par réaction du verre ou du silicium soumis préalablement à une oxydation, avec  
5 un agent de silanisation hydrophobe.

17. Procédé selon la revendication 16, dans lequel l'agent de silanisation hydrophobe est un silane de formule :



dans laquelle  $R^1$ ,  $R^2$  et  $R^3$  qui peuvent être identiques ou différents, sont choisis parmi les groupes alcoxy en  $C_1$  à  $C_3$  et les atomes d'halogène, et  $R^4$  est un groupe  
15 hydrocarboné ou fluorocarboné, linéaire ou ramifié.

18. Procédé selon l'une quelconque des revendications 10 à 13, dans lequel le support étant en silicium ou en verre, on forme le matériau hydrophile par réaction du verre ou du silicium qui a été soumis  
20 préalablement à une oxydation, avec un agent de silanisation hydrophile.

19. Procédé selon la revendication 18, dans lequel l'agent de silanisation hydrophile est un silane de formule :



dans laquelle  $R^1$ ,  $R^2$  et  $R^3$  qui peuvent être identiques ou différents, sont choisis parmi les groupes alcoxy en  $C_1$  à  $C_3$  et les atomes d'halogène, et  $R^5$  est un groupe

hydrocarboné, linéaire ou ramifié, comportant au moins un groupe hydrophile choisi parmi les groupes époxy, -OH, -SH, -NH<sub>2</sub>, -NH- et -COOH.

20. Procédé selon la revendication 13, dans lequel on forme le matériau hydrophobe par réaction d'une couche métallique en or, argent, cuivre ou un de leurs alliages, déposée sur les zones du support qui doivent être formées du matériau hydrophobe, par réaction de cette couche avec un thiol ou un disulfure comportant un groupe hydrocarboné ou fluorocarboné hydrophobe.

21. Procédé selon l'une quelconque des revendications 10 à 13, dans lequel on forme le matériau hydrophile par réaction d'une couche métallique en or, argent, cuivre ou un de leurs alliages, déposée sur les zones du support qui doivent être formées du matériau hydrophile, par réaction de cette couche avec un thiol ou un disulfure comportant au moins un groupe hydrophile choisi parmi les groupes époxy, -OH, -SH, -NH-, -NH<sub>2</sub> et -COOH.

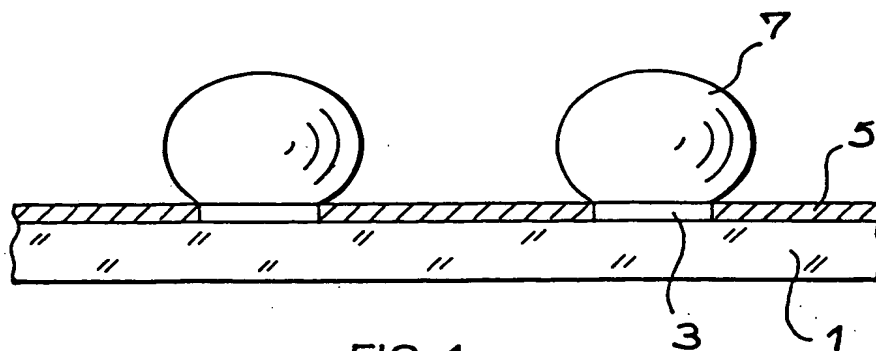


FIG. 1

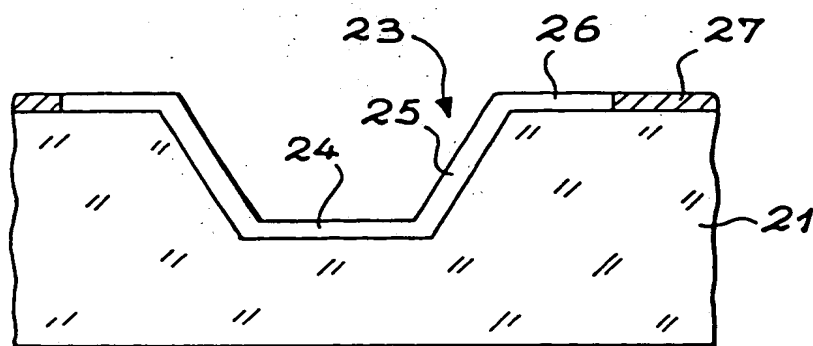


FIG. 2

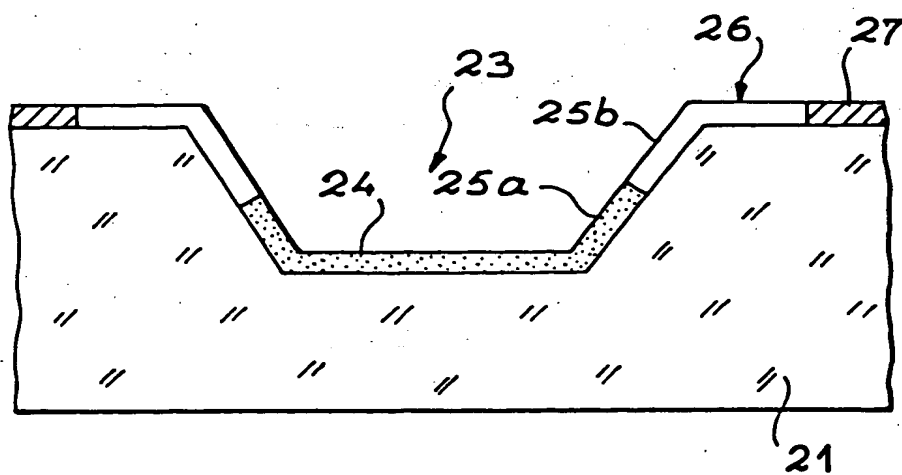


FIG. 3

2/7

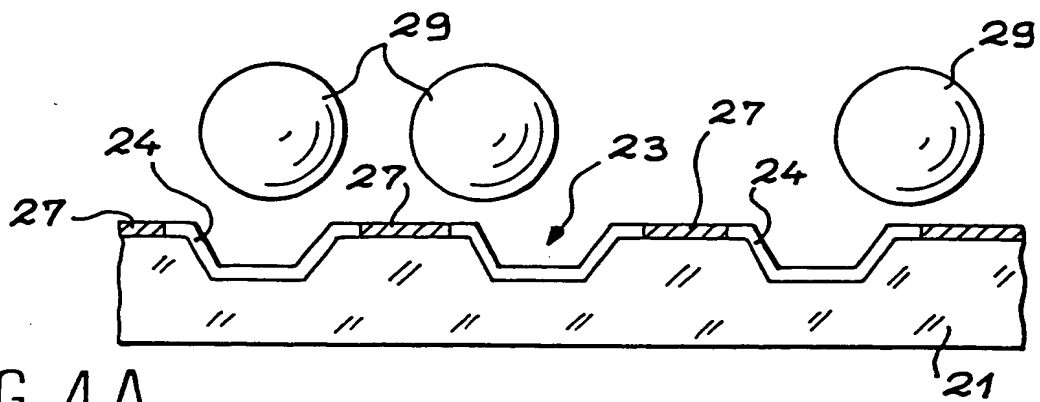


FIG. 4 A

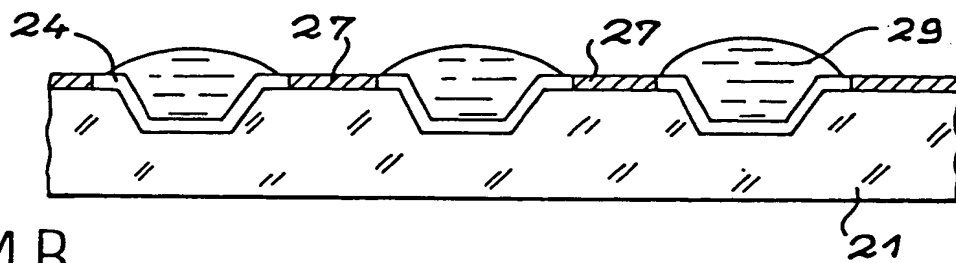


FIG. 4 B

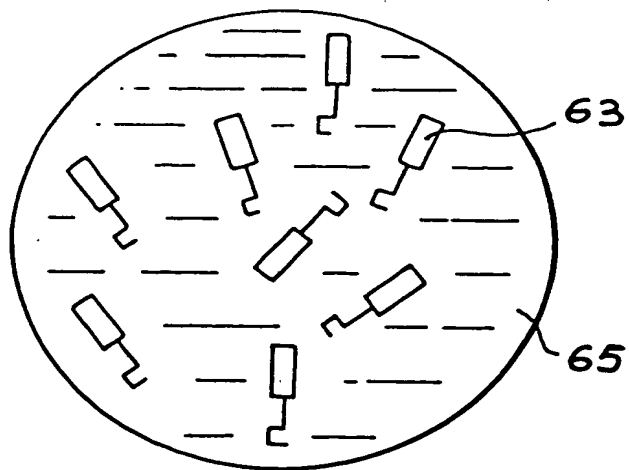
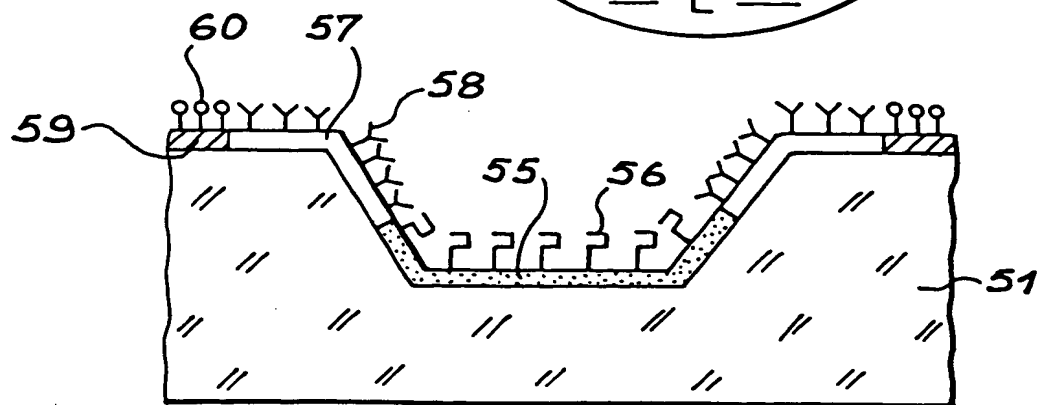


FIG. 5



This diagram shows a cross-sectional view of a semiconductor device. A central trench is formed in a substrate. The trench is lined with a layer labeled 55. The bottom of the trench is a layer labeled 56. The top surface of the trench is a layer labeled 57. On the left and right sides of the trench, there are structures labeled 59. The top surface of the device is a layer labeled 63. The side walls of the trench are labeled 64. The substrate is indicated by diagonal lines.

FIG. 7

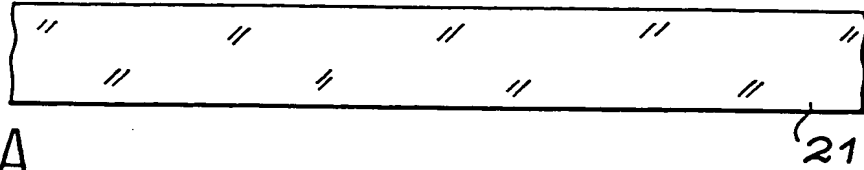


FIG. 8 A

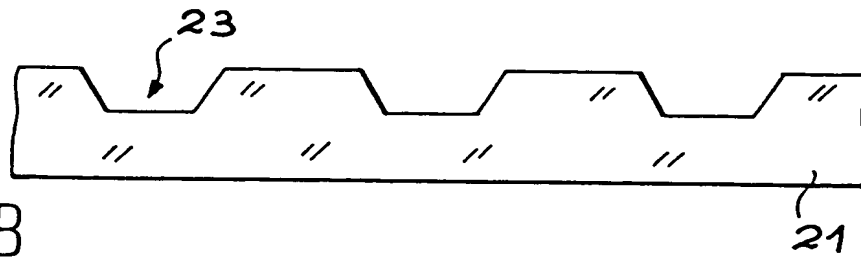


FIG. 8 B

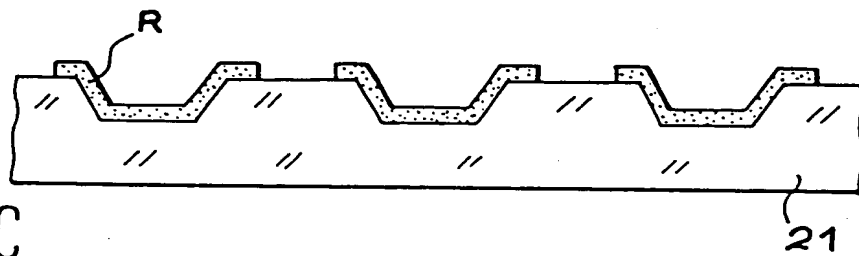


FIG. 8 C

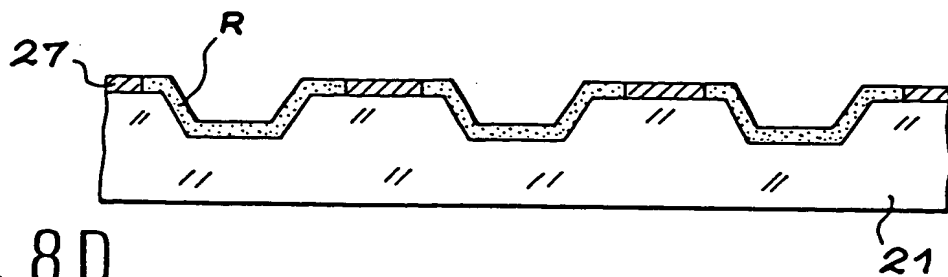


FIG. 8 D

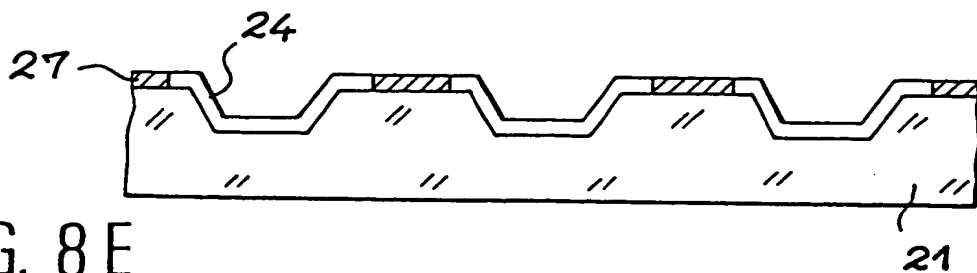


FIG. 8 E



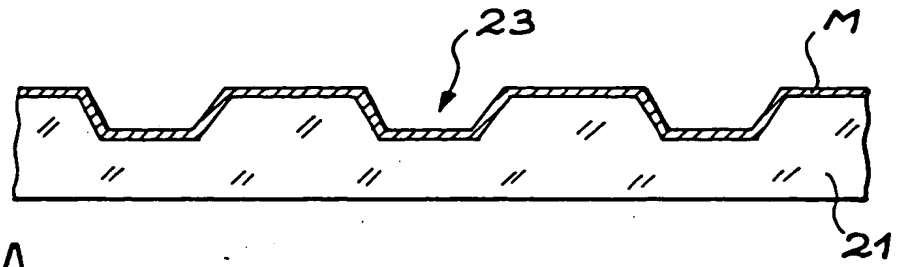


FIG. 9 A

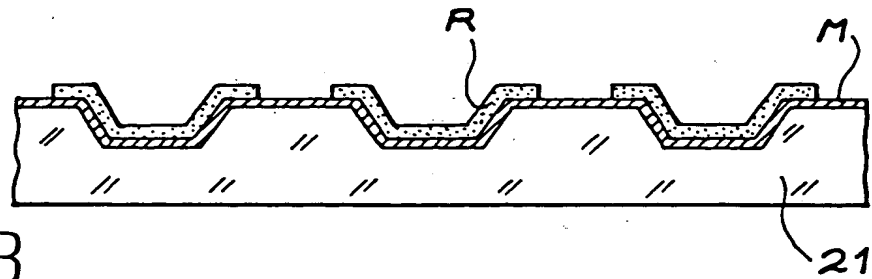


FIG. 9 B

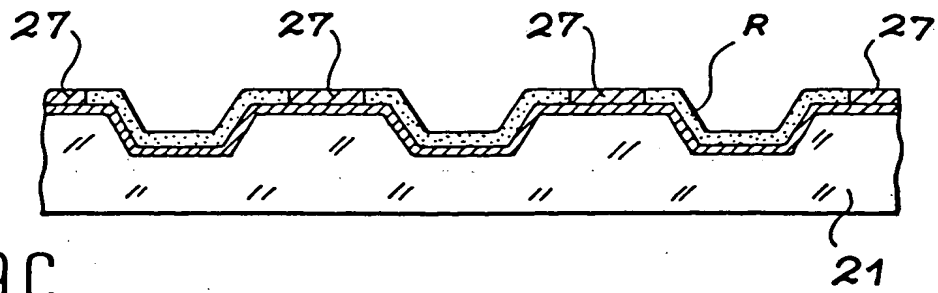


FIG. 9 C

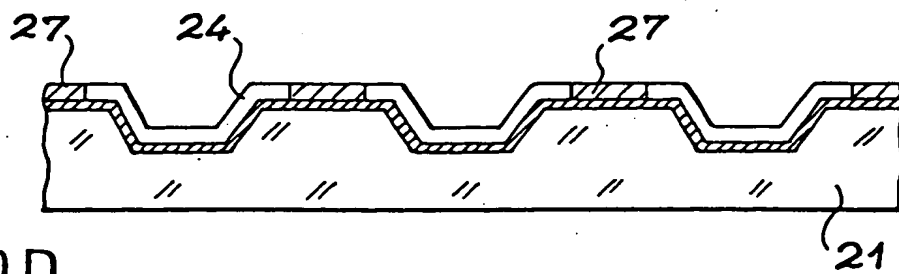


FIG. 9 D

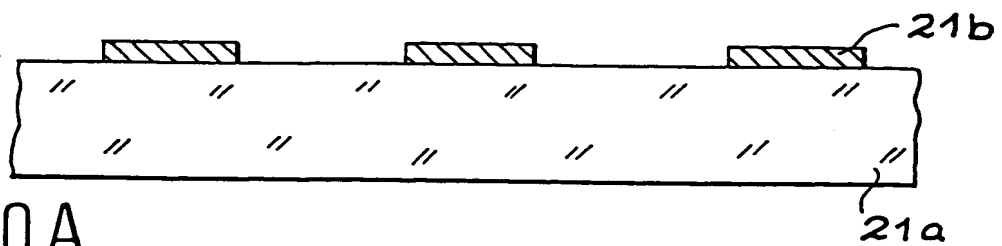


FIG. 10 A

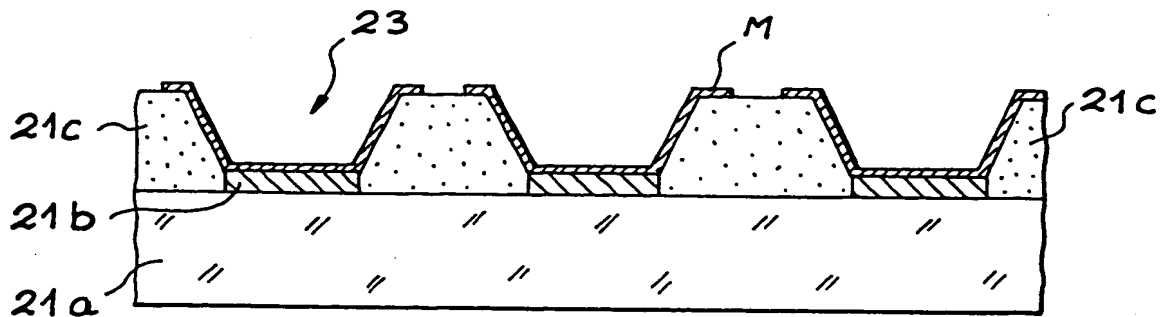


FIG. 10 B

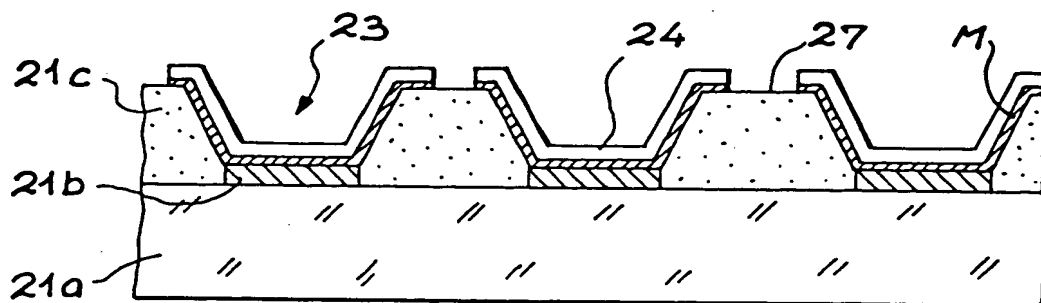


FIG. 10 C

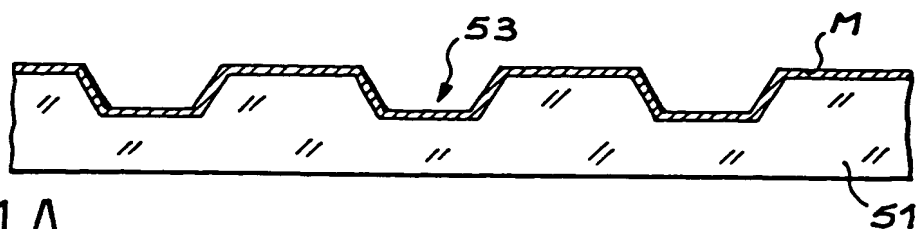


FIG. 11 A

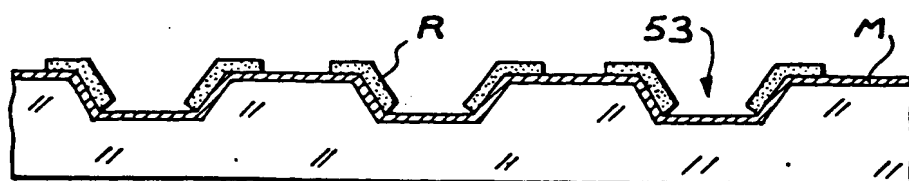


FIG. 11 B

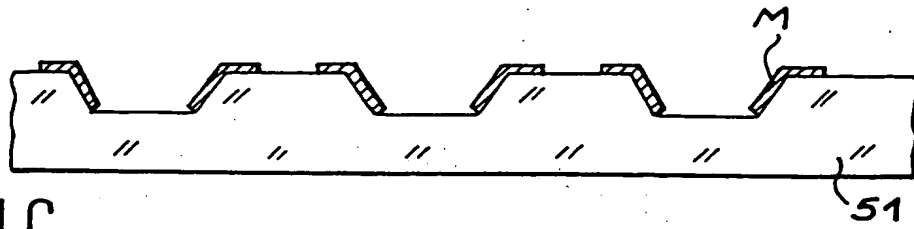


FIG. 11 C

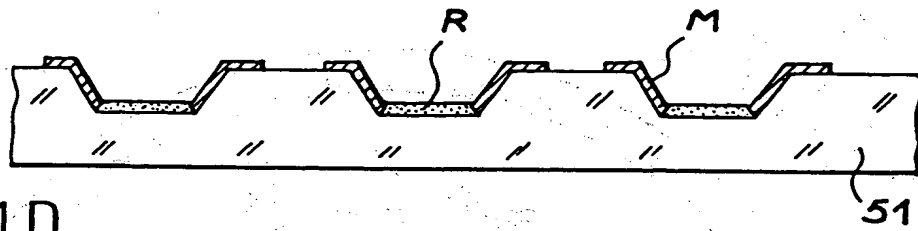


FIG. 11 D

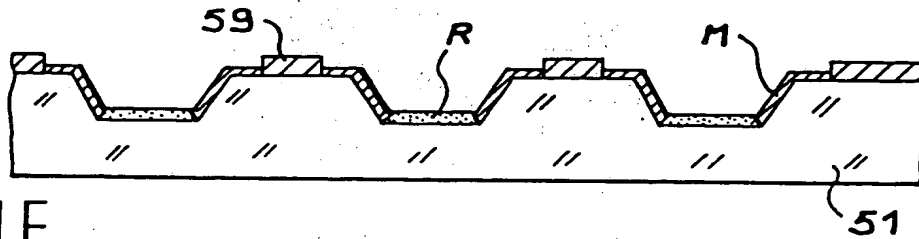


FIG. 11 E

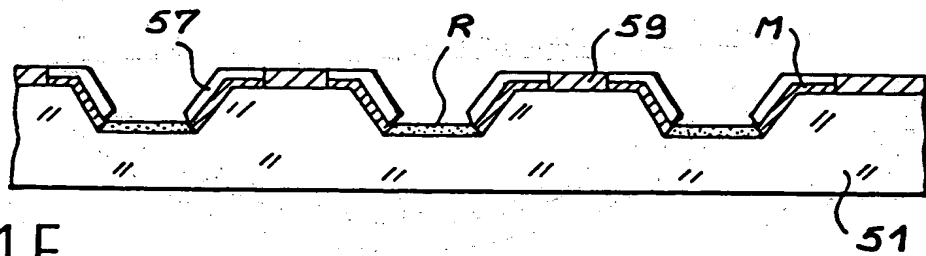


FIG. 11 F

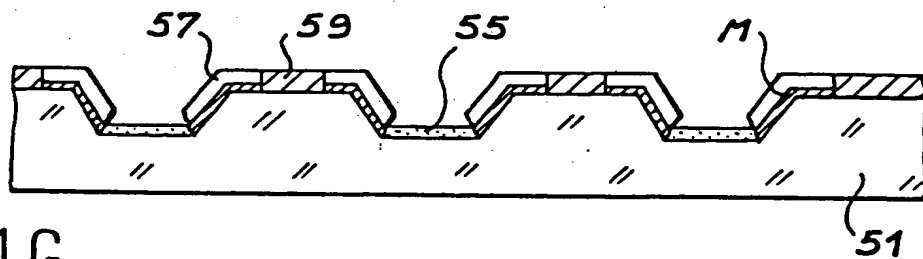


FIG. 11 G

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

---